11 月 November
2020, 63(11): 1377 – 1384

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

http: //www. insect. org. cn
doi: 10. 16380/j. kcxb. 2020. 11. 010

基于线粒体基因和核基因的中华虎凤蝶指名亚种地理种群遗传分化分析

向 颖[1,2], 董婉未[3], 蒋国芳[2,3,*], 洪 芳[2], 张佑祥[1,*], 张文武[4]

(1. 吉首大学生物资源与环境科学学院, 湖南吉首 416000; 2. 泉州师范学院海洋与食品学院, 福建泉州 362000;
3. 南京师范大学生命科学学院, 江苏省生物多样性与生物技术重点实验室, 南京 210023;
4. 湖南乌云界国家级自然保护区管理局, 湖南常德 415700)

摘要:【目的】探讨中华虎凤蝶指名亚种 *Luehdorfia chinensis chinensis* 地理种群的遗传分化情况。【方法】采用 PCR 技术对中华虎凤蝶指名亚种 5 个地理种群 60 头个体的线粒体 *COI* 基因和 3 个非编码核基因(*ITS*2, *Pgi-intron* 和 *Tpi-intron*) 片段进行扩增,利用 MEGA, DnaSP 和 Arlequin 软件对这 5 个地理种群的遗传变异、遗传多样性及遗传分化进行分析,并进行种群历史动态推断分析。【结果】中华虎凤蝶指名亚种地理种群线粒体基因 *COI* 和其他 3 个非编码核基因(*ITS*2, *Pgi-intron* 和 *Tpi-intron*)片段的碱基序列具有较强的 AT 偏好性。总群体的核苷酸多样性 $\pi = 0.00686$,平均核苷酸差异数 $K = 18.289$,总群体遗传多样性较高;地理种群间遗传分化程度较大($Fst = 0.4910$),基因交流($Nm = 0.2600$)不频繁。分子方差分析(AMOVA)表明,中华虎凤蝶指名亚种的遗传分化主要来自种群内部(52.79%); Mantel 检验表明,地理种群间的地理距离与遗传距离是显著正相关关系($R = 0.8519$, $P < 0.05$)。【结论】本研究检测的中华虎凤蝶指名亚种 5 个地理种群遗传多样性较高,各地理种群间具有明显的遗传分化,基因交流较少;地理距离是影响地理种群间遗传分化的重要因素之一;总群体近期并没有经历种群扩张。

关键词: 中华虎凤蝶; 地理种群; 遗传多样性; 遗传分化; 种群结构; *COI*; *ITS*2; *Pgi-intron*; *Tpi-intron*

中图分类号: Q963　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 0454-6296(2020)11-1377-08

Analysis of the genetic differentiation among geographical populations of *Luehdorfia chinensis chinensis* (Lepidoptera: Papilionidae) based on mitochondrial gene and nuclear genes

XIANG Ying[1,2], DONG Wan-Wei[3], JIANG Guo-Fang[2,3,*], HONG Fang[2], ZHANG You-Xiang[1,*], ZHANG Wen-Wu[4] (1. College of Biology and Environmental Sciences, Jishou University, Jishou, Hunan 416000, China; 2. College of Oceanology and Food Science, Quanzhou Normal University, Quanzhou, Fujian 362000, China; 3. Jiangsu Key Laboratory for Biodiversity and Biotechnology, College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China; 4. Wuyunjie National Nature Reserve Administration Bureau, Changde, Hunan 415700, China)

Abstract:【Aim】To investigate the genetic differentiation of geographical populations of *Luehdorfia chinensis chinensis*.【Methods】The mitochondrial *COI* gene and the non-coding fragments of three nuclear genes (*ITS*2, *Pgi-intron* and *Tpi-intron*) of 60 individuals from five geographical populations of

基金项目: 国家自然科学基金项目(30970339, 31970449); 吉首大学 2019 年度研究生校级科研项目(Jdy19051)
作者简介: 向颖, 女, 1995 年 9 月生, 湖南怀化人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫生态学, E-mail: 1669647818@qq.com
* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: cnjgf1208@163.com; zhangyouxia126@126.com
收稿日期 Received: 2020-03-19; 接受日期 Accepted: 2020-07-31

L. chinensis chinensis were amplified by PCR. The genetic variation, genetic diversity and genetic differentiation of the five geographical populations were analyzed by using MEGA, DnaSP and Arlequin software, and their demography was inferred. 【Results】The base sequences of the mitochondrial gene *COI* and the non-coding fragments of the three nuclear genes *ITS2*, *Pgi-intron* and *Tpi-intron* of the geographical populations of *L. chinensis chinensis* have strong AT bias. The nucleotide diversity index (π) and the average number of nucleotide differences (K) of the total population were 0.00686 and 18.289, respectively, indicating a high genetic diversity of the total population. The total fixed coefficient (Fst) and the total gene flow (Nm) were 0.4910 and 0.2600, respectively, suggesting that the genetic differentiation among geographical populations is large and the gene communication infrequent. The analysis of molecular variance (AMOVA) showed that the genetic differentiation of *L. chinensis chinensis* mainly came within a population (52.79%). The Mantel test showed that the geographical distance between populations had a significant positive correlation with the genetic distance ($R = 0.8519$, $P < 0.05$). 【Conclusion】The five geographical populations of *L. chinensis chinensis* tested in this study exhibit high genetic diversity, and there are obvious genetic differentiation and little gene communication among the geographical populations. Geographical distance is one of the important factors affecting genetic differentiation among the geographical populations of *L. chinensis chinensis*. The total population of *L. chinensis chinensis* has not experienced any recent population expansion.

Key words: *Luehdorfia chinensis*; geographical population; genetic diversity; genetic differentiation; population structure; *COI*; *ITS2*; *Pgi-intron*; *Tpi-intron*

种群是生物进化的基本单位,种群遗传分化研究是生物遗传多样性与物种进化的核心问题之一(Frankham *et al*., 2004)。探讨珍稀保护生物的种群遗传多样性和分化、种群历史动态等,不仅可以帮助我们理解种群形成及其演化过程,外界因素对该种群遗传特性的影响以及种群的生态适应性(Slatkin, 1987),还可以为扩大其种群数量及相关保护策略的制定提供理论依据。

随着分子生物学的发展和相关技术的实践应用,种群分化研究所应用的分子标记也越来越多,如线粒体、核糖体和微卫星等(Sei and Porter, 2007; Kodandaramaiah *et al*., 2012)。mtDNA 已成为谱系地理学研究中最常用的分子标记(张代臻等, 2008),而核基因则能够补充 mtDNA 不具备的信息。所以,将两类不同进化速率和遗传方式的分子标记(线粒体基因和核基因)相结合进行种群遗传结构分析,结果将更加全面可靠。近年来,已有学者利用这两类分子标记对蝴蝶种群遗传多样性(Bull *et al*., 2006)、种群遗传结构(Czajkowska *et al*., 2020)、种群历史动态(Flanagan *et al*., 2004)和生物地理格局及其形成历史(Dincă *et al*., 2011)等进行了深入探讨。

中华虎凤蝶 *Luehdorfia chinensis* 隶属鳞翅目(Lepidoptera)凤蝶科(Papilionidae)虎凤蝶属 *Luehdorfia*。该蝶仅分布于我国秦岭和长江中下游部分地区(董思雨等, 2014),是中国特有的蝴蝶,属国家二级保护野生动物,极具生态保护与观赏价值。目前关于中华虎凤蝶的分布范围(何桂强等, 2011; 李密等, 2012)、生物学特性(童雪松和潜祖琪, 1992; 王文明等, 2010)、保护现状(袁德成等, 1998)和食性研究(姚洪渭等, 1999; 姚肖永等, 2008)等方面均有报道,但中华虎凤蝶种群遗传分化研究的相关报道缺乏。本研究首次采用 4 个分子遗传标记,即线粒体 *COI* 基因和 3 个非编码核基因(*ITS2*, *Pgi-intron* 和 *Tpi-intron*)片段,研究我国 5 个地区(江苏、浙江、安徽、江西和湖南)的中华虎凤蝶指名亚种 *L. chinensis chinensis* 地理种群间的遗传分化,以期为中华虎凤蝶的种群保护提供重要科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

本研究所用中华虎凤蝶指名亚种 60 头幼虫样本于 2013 – 2014 年间分别采集自江西、浙江、安徽、江苏和湖南 5 个地区。收集到的样本均浸泡在无水乙醇中保存备用。详细信息见表 1。

表 1　中华虎凤蝶指名亚种样本采集信息

Table 1　Collecting data of samples of *Luehdorfia chinensis chinensis* in China

种群 Populations	采样地点 Collecting locality	经纬度 Latitude and longitude	采集日期(年-月) Collecting date (year-month)	样本数量 Number of specimens
BHS	江苏宝华山 Baohuashan, Jiangsu	32.140866°N, 119.093557°E	2013-03	12
WYJ	湖南乌云界 Wuyunjie, Hunan	28.914083°N, 111.480721°E	2013-03	12
HZ	浙江杭州 Hangzhou, Zhejiang	30.370808°N, 120.206311°E	2014-03	12
CZ	安徽滁州 Chuzhou, Anhui	32.300151°N, 118.329983°E	2014-03	12
THL	江西桃红岭 Taohongling, Jiangxi	29.861844°N, 116.612479°E	2014-03	12

1.2　PCR 扩增及测序

使用 Progema 试剂盒分别提取中华虎凤蝶指名亚种各地理种群各头幼虫样本的总 DNA，经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测，保存于 －20℃ 冰箱中备用。本研究选取了线粒体基因 *COI* 以及非编码核基因 *ITS2*、*Pgi-intron* 和 *Tpi-intron* 作为目的基因。线粒体基因 *COI* 的引物是依据中华虎凤蝶线粒体全基因组序列(Liu *et al.*, 2013)设计；而核基因引物是根据 EPIC(exon-primed-intron-crossing)方法(Jennings and Etter, 2011)设计。引物均由南京金斯瑞生物科技有限公司合成，引物的详细信息见表 2。PCR 扩增反应体系(25 μL)：模板 DNA 1 μL，上下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL，10 × PCR Buffer 2.5 μL，$MgCl_2$(20 μmol/L) 2 μL，dNTPs (10 μmol /L) 2 μL，Taq 酶(2 U/μL) 0.2 μL，ddH_2O 16.3 μL。PCR 扩增程序：95℃ 预变性 5 min；95℃ 变性 30 s，55℃(核基因)或 51℃(*COI*)退火 30 s，35 个循环；72℃ 延伸 1 min(核基因)或 30 s(*COI*)；循环结束后 72℃ 延伸补齐 10 min，4℃ 保温。所有 PCR 产物送至南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序。

表 2　引物信息

Table 2　Primer information

基因 Genes	GenBank 登录号 GenBank accession number	引物序列(5′－3′) Primer sequences	Tm (℃)
COI	KP061154 – KP061213	F：ATTCAACCAATCATAAAGATAT R：TAAACTTCTGGATGTCCAAAAA	51
ITS2	KP296861 – KP296920	F：TAACTGCGCGTCATAGTGTGAACT R：ATCCTCCCTGATCTGAGGCCA	55
Pgi-intron	KP327782 – KP327841	F：ATCGGGAATGGCACCAGAATCTATT R：TGAAGATCTTGTGCTCGTACATAG	55
Tpi-intron	KP327722 – KP327781	F：TAGTAGAACGGAGTGCTAGTGATTATA R：ATATTGGATACGCACAGCATTAGCAACAT	55

1.3　数据分析

利用 DNASTAR (Burland, 2000)和 MEGA 7.0 (Kumar *et al.*, 2016)对扩增基因进行校正比对，分析序列碱基组成及序列变异情况。使用 SequenceMatrix 软件将 4 个分子标记串联后进行以下分析：使用 DnaSP 5.10.1 (Librado and Rozas, 2009)计算所有采集到的 5 个种群的多态性位点数(S)、核苷酸多样性(π)和平均核苷酸差异数(K)。使用软件 Arlequin v3.5.1.3 (Excoffier and Lischer, 2010)进行种群结构和遗传变异分析，计算各地理种群的 Tajima's *D* 值(Tajima, 1989)、Fu's *Fs* 值(Fu, 1997)、基因流(*Nm*)及群体间的分化指数(*Fst*)。群体间 *Fst* 系数和基因流(*Nm*)分别是衡量种群间遗传分化程度和基因交流程度大小的指数(Hudson *et al.*, 1992；Rousset, 1997)，$Fst > 0.25$ 和 $Nm < 1$，则种群遗传分化大，基因流小。

为检验种群间的遗传分化与种群间的地理距离是否具有相关性，在 MEGA 7.0 中利用 Kimura 2-Parameter (K2P)模型分别计算地理种群的遗传距离。根据经纬度计算各采样地点的地理距离及其自然对数，利用 PC-ORD 5 软件(Grandin, 2006)对遗传距离及地理距离的自然对数进行 Mantel 检验，分析地理种群间遗传距离和地理距离的相关性。

2　结果

2.1　碱基组成及序列变异

对 5 个中华虎凤蝶指名亚种地理种群共 60 头

供试样本分别进行了 *COI* 和 *ITS2*, *Pgi-intron* 和 *Tpi-intron* 4 个基因片段扩增测序,每个基因片段各获得了 60 条序列。各基因片段的 GenBank 登录号见表 1,序列特征和变异信息见表 3。*COI* 基因的变异位点和简约信息位点最少,A, G, C 和 T 平均含量分别为30.62%, 13.72%, 14.74% 和 40.92%,符合昆虫线粒体基因序列组成(Liu and Beckenbach, 1992)。使用 3 对核基因序列扩增引物对中华虎凤蝶指名亚种样本 DNA 进行扩增,获得的基因序列长度分别为 760 bp (*ITS2*), 1 122 bp (*Pgi-intron*)和 757 bp (*Tpi-intron*),*Tpi-intron* 变异位点和简约信息位点最多,其次是 *Pgi-intron* 和 *ITS2*。4 个基因序列串联后的基因序列(以下简称"合并序列")全长为 3 277 bp,A + T% (66.6%) > G + C% (33.4%),和 *COI* 基因一样,有较强的 AT 偏好性。

表 3 中华虎凤蝶指名亚种地理种群线粒体基因和核基因序列的碱基组成及变异

Table 3 Base composition and variation of mitochondrial and nuclear gene sequences of geographical populations of *Luehdorfia chinensis chinensis*

分子标记 Molecular markers	平均碱基组成(%) Average base composition				序列长度(bp) Sequence length	变异位点数(*V*) Number of variation sites	简约信息位点数(*P*) Number of parsimony informative sites
	A	G	C	T			
COI	30.62	13.72	14.74	40.92	627	4	4
ITS2	21.19	28.73	25.22	24.86	760	14	9
Pgi-intron	32.69	17.00	17.41	32.90	1 122	32	22
Tpi-intron	38.47	13.98	13.35	34.20	757	78	67
合并序列 Combined sequence	32.40	16.60	16.80	34.20	3 277	113	95

合并序列为线粒体基因 *COI* 和核基因片段(*ITS2*, *Pgi-intron* 和 *Tpi-intron*)序列串联后的基因序列。The sequences of mitochondrial gene *COI* and nuclear gene fragments (*ITS2*, *Pgi-intron* and *Tpi-intron*) were combined as the combined sequence. 下同 The same below

2.2 遗传多样性

基于合并序列对中华虎凤蝶指名亚种 5 个地理种群进行遗传多样性分析,结果见表 4。总群体核苷酸多样性(π)为 0.00686,平均核苷酸差异数(K)为 18.289。各地理种群内核苷酸多样性(π)为 0.00121 ~ 0.01138,多态性位点数(S)为 7 ~ 92,其中宝华山种群(BHS)的 π 和 S 均为最小,而桃红岭种群(THL)的均为最大。

表 4 基于线粒体基因和核基因合并序列的中华虎凤蝶指名亚种地理种群的遗传多样性和中性检验

Table 4 Genetic diversity and neutrality test among geographical populations of *Luehdorfia chinensis chinensis* based on the combined sequence of mitochondrial and nuclear genes

种群 Populations	多态性位点数(S) Number of polymorphic sites	核苷酸多样性(π) Nucleotide diversity	平均核苷酸差异数(K) Average number of nucleotide differences	中性检验 Neutrality test	
				Tajima's D	Fu's Fs
BHS	7	0.00121	3.267	1.79976*	2.20122*
THL	92	0.01138	30.551	1.78425*	0.84657
HZ	18	0.00217	5.797	1.54165	0.73113
CZ	16	0.00223	5.993	1.76057*	1.41956
WYJ	20	0.00221	7.205	0.52292	0.50456
总种群 Total population	108	0.00686	18.289	2.52028	-0.32628

种群信息见表 1。For population information, see Table 1. 下同 The same below. * $P < 0.05$.

2.3 遗传分化

基于合并序列的种群间分化指数和基因流如表 5 所示,总群体 *Fst* 为 0.4910,*Nm* 为 0.2600,说明地理种群间的遗传分化程度较大。宝华山种群(BHS)和乌云界种群(WYJ) *Fst* 最大(0.7819),*Nm* 最小(0.1394),两地理种群间分化程度高,基因交流不频繁;而宝华山种群(BHS)和滁州种群(CZ) *Fst* 最小(0.0812),*Nm* 最大(5.6582),说明它们基因交流程度高,遗传分化较小。对中华虎凤蝶指名亚种地理种群进行 AMOVA 分析(表 6),结果表明中华虎凤蝶指明亚种的变异主要是来自于种群内部(52.79%),群体间的遗传变异略小。

表 5　基于线粒体基因和核基因合并序列的中华虎凤蝶指名亚种地理种群的配对种群间分化指数（*Fst*）（下三角）和基因流（*Nm*）（上三角）

Table 5　Genetic differentiation（*Fst*）（below diagonal） and gene flow（*Nm*）（above diagonal） between geographical populations of *Luehdorfia chinensis chinensis* based on the combined sequence of mitochondrial and nuclear genes

种群 Populations	BHS	CZ	HZ	THL	WYJ
BHS		5.6582	0.7591	0.9271	0.1394
CZ	0.0812		1.1952	1.1745	0.1933
HZ	0.3971	0.2950		0.9343	0.1678
THL	0.3504	0.2986	0.3486		2.0351
WYJ	0.7819	0.7212	0.7487	0.1972	

表 6　基于线粒体基因和核基因合并序列的中华虎凤蝶指名亚种地理种群的分子方差分析（AMOVA）

Table 6　Analysis of molecular variance（AMOVA）in geographical populations of *Luehdorfia chinensis chinensis* based on the combined sequence of mitochondrial and nuclear genes

变异来源 Source of variation	自由度 *d. f.*	平方和 Sum of squares	方差组分 Variance components	变异百分率 Percentage of variation
种群间 Among populations	4	477.300	4.7505*Va*	47.2085
种群内 Within a population	115	610.917	5.3123*Vb*	52.7915
总群体 Total population	119	1 088.217	10.0626	

Va：种群间方差组分 Variance components among populations；*Vb*：种群内方差组分 Variance components within populations.

表 7　基于线粒体基因和核基因合并序列的中华虎凤蝶指名亚种地理种群间的成对遗传距离（下三角）与地理距离（km）自然对数值（上三角）

Table 7　The pairwise genetic distance（below diagonal） and natural logarithm of geographical distance（km）（above diagonal） between geographical populations of *Luehdorfia chinensis chinensis* based on the combined sequence of mitochondrial and nuclear genes

种群 Populations	BHS	CZ	HZ	THL	WYJ
BHS		4.3038	5.4091	5.8481	6.6501
CZ	0.0019		5.6308	5.7577	6.6276
HZ	0.0028	0.0031		5.8587	6.7551
THL	0.0098	0.0098	0.0105		6.2309
WYJ	0.0096	0.0094	0.0103	0.0090	

2.4　种群历史动态

基于合并序列对中华虎凤蝶指名亚种地理种群中性检验和错配分布进行分析（图 1 和表 4），总种群的 Tajima's *D* 和 Fu's *Fs* 分别为 2.52028 和 −0.32628，但不显著，而且总种群的错配分布图呈现多峰分布。对各种群来讲，Tajima's *D* 和 Fu's *Fs* 均为正值，这表明近期各种群都没有出现扩张。

依据 Kimura 2-Parameter 双参数模型，基于合并序列计算中华虎凤蝶指名亚种地理种群间的遗传距离（表 7）。各地理种群的遗传距离在 0.0019 ~ 0.0105 之间，遗传距离最大的是杭州种群（HZ）和桃红岭种群（THL）（0.0105），最小的为滁州种群（CZ）和宝华山种群（BHS）（0.0019）。就地理距离来讲，相距最近的是滁州种群（CZ）和宝华山种群（BHS），相距最远的为乌云界种群（WYJ）和杭州种群（HZ）。对地理种群间的地理距离的对数值和遗传距离进行 Mantel 相关性检验，结果显示 $R = 0.8519$，$P = 0.018 < 0.05$，表明中华虎凤蝶指名亚种各地理种群间的地理距离和遗传距离呈正相关关系。

3　讨论

核苷酸多样性（π）是评价物种遗传多样性的重要参数（Grant and Bowen, 1998），基因联合片段序列 $\pi > 0.005$，表明中华虎凤蝶指名亚种总种群遗传多样性较高。合并基因序列的 AMOVA 分析结果表明遗传分化主要来自种群内部，呼晓庆和杨兆富（2019）对中国草地螟 *Loxostege sticticalis* 地理种群的遗传分析中也得出了类似结果。

有研究表明，对植食性昆虫而言，地理隔离和寄主植物分化是使不同种群产生遗传分化重要原因（Forbes *et al.*, 2017；朱诗禹等, 2017；Goodman *et al.*, 2019）。中华虎凤蝶指名亚种总种群 $Fst > 0.4$，$Nm < 1$，表明种群间的遗传分化大，基因交流少。Mantel 检验结果表明遗传距离与地理距离呈现正相关性，而许多其他研究也得出类似结论（薛进等, 2007；谢艳兰等, 2019）。值得注意的是 WYJ 种群和 BHS, CZ 及 HZ 种群的遗传分化非常大（$Fst > 0.65$，$Nm < 1$），我们认为这不仅仅和地理隔离有关，寄主植物的分化也产生了重要影响；BHS, CZ 及 HZ

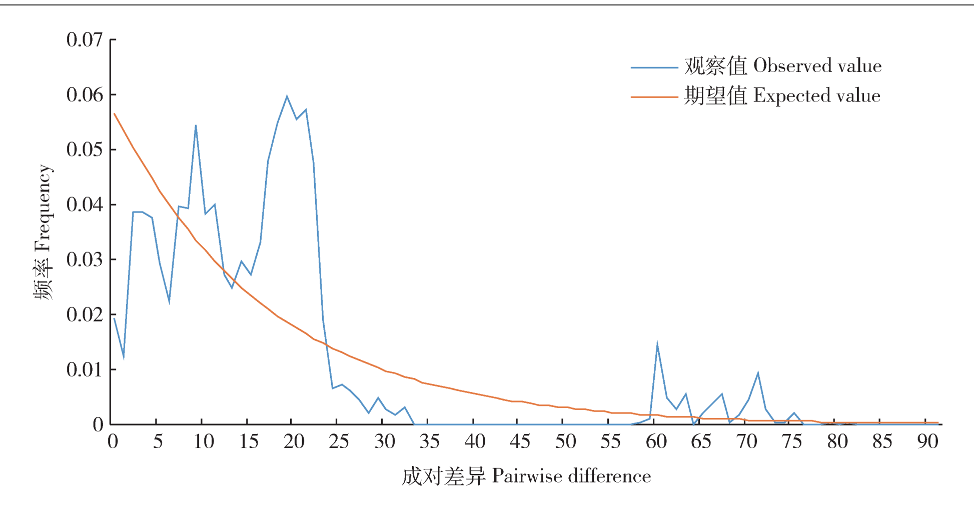


图 1 基于线粒体基因和核基因合并序列的中华虎凤蝶指名亚种地理种群的错配分布

Fig. 1 Mismatch distribution analysis of geographical populations of *Luehdorfia chinensis chinensis* based on the combined sequence of mitochondrial and nuclear genes

种群属于低海拔类群，寄主植物为杜蘅 *Asarum forbesii*（袁德成等，1998；王文明等，2010），而 WYJ 种群是高海拔种群，寄主植物为细辛 *A. sieboldii*（谭济才等，2010），中华虎凤蝶不同地理种群对不同寄主植物产生了适应性进化。

Tajima's *D* 和 Fu's *Fs* 检验是可反映出种群变化动态历史的中性检验方法。Fu's *Fs* 和 Tajima's *D* 检验值 <0 时，则表明种群有扩张及瓶颈效应，反之则种群稳定（Harpending *et al*., 1998；Ramos-Onsins and Rozas, 2002）。中华虎凤蝶指名亚种各种群 Tajima's *D* 值均大于 0，Fu's *Fs* 值不显著，由此推测，中华虎凤蝶指名亚种在历史上并没有发生种群扩张。错配分布是以可视化方式体现群体历史动态，当种群形成历史较短或发生扩张时，其错配分布曲线呈现单峰；而当种群为存在时间较长且稳定的种群时，错配分布曲线则呈现多峰曲线分布（Excoffier and Lischer, 2010；苏军虎等，2017）。中华虎凤蝶指名亚种总种群错配分布图呈现多峰分布，其种群在历史上较稳定。综上，中华虎凤蝶指名亚种各地理种群较稳定，近期没有经历明显的种群扩张。

本研究采用 4 个分子标记对中华虎凤蝶指名亚种 5 个地理种群进行研究，结果显示各地理种群遗传多样性较高，遗传变异较丰富，物种的环境适应能力较强，较容易在新的环境中生存，表明近年来中华虎凤蝶的保护工作是有一定成效的。但值得注意的是，中华虎凤蝶种群分布格局具有密度低、种群间隔大的特征（袁德成等，1998；董思雨等，2014）。因此，在后续的保护工作中不能掉以轻心，应继续保护好其栖息地和寄主植物资源，严禁采挖；对于种群数量小的野外种群也可以输入人工繁育个体保证其有效种群大小。

致谢 本研究所用部分蝴蝶幼虫由江西中医学院贾凤海教授、滁州学院褚立新教授和浙江杭州楼信权先生提供，在此深表谢意！

参考文献（References）

Bull V, Beltrán M, Jiggins CD, McMillan WO, Bermingha E, Mallet J, 2006. Polyphyly and gene flow between nonsibling *Heliconius* species. *BMC Biol*., 4: 11.

Burland TG, 2000. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. In: Misener S, Krawetz SA eds. Bioinformatics Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology™, Vol. 132. Humana Press, Totowa, NJ. 71 – 91.

Czajkowska M, Dawidowicz Ł, Borkowska A, Dziekańska I, Sielezniew M, 2020. Population genetic structure and demography of the critically endangered chequered blue butterfly (*Scolitantides orion*) in a highly isolated part of its distribution range. *Insects*, 11: 608.

Dincă V, Dapporto L, Vila R, 2011. A combined genetic-morphometric analysis unravels the complex biogeographical history of *Polyommatus icarus* and *Polyommatus celina* common blue butterflies. *Mol. Ecol*., 20(18): 3921 – 3935.

Dong SY, Jiang GF, Hong F, 2014. Advances in conservation biology of the rare and threatened butterfly genus *Luehdorfia* (Lepidoptera: Papilionidae). *Chin. J. Appl. Environ. Biol*., 20(6): 1139 – 1144. ［董思雨，蒋国芳，洪芳，2014. 珍稀濒危蝴蝶——虎凤蝶的生物生态学研究进展. 应用与环境生物学报，20(6): 1139 – 1144］

Excoffier L, Lischer HE, 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and

Windows. *Mol. Ecol. Resour.*, 10(3): 564 – 567.

Flanagan NS, Tobler A, Davison A, Pybus OG, Kapan DD, Planas S, Linares M, Heckel D, McMillan WO, 2004. Historical demography of Müllerian mimicry in the neotropical *Heliconius* butterflies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(26): 9704 – 9709.

Forbes AA, Devine SN, Hippee AC, Tvedte ES, Ward AKG, Widmayer HA, Wilson CJ, 2017. Revisiting the particular role of host shifts in initiating insect speciation. *Evolution*, 71(5): 1126 – 1137.

Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA, McInnes KH, 2004. A Primer of Conservation Genetics. Cambridge University Press, Cambridge. 1 – 60.

Fu YX, 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147(2): 915 – 925.

Goodman KR, Prost S, Bi K, Brewer MS, Gillespie RG, 2019. Host and geography together drive early adaptive radiation of Hawaiian planthoppers. *Mol. Ecol.*, 28(19): 4513 – 4528.

Grandin U, 2006. PC-ORD version 5: a user-friendly toolbox for ecologists. *J. Veg. Sci.*, 17(6): 843 – 844.

Grant WAS, Bowen BW, 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *J. Hered.*, 89(5): 415 – 426.

Harpending HC, Batzer MA, Gurven M, Jorde LB, Rogers AR, Sherry ST, 1998. Genetic traces of ancient demography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(4): 1961 – 1967.

He GQ, Jia FH, Zhu HB, 2011. The species distribution and quantity surveying of *Luehdorfia chinensis* (Leech) in Jiangxi. *J. Jiangxi Univ. Tradit. Chin. Med.*, 23(2): 75 – 76. [何桂强, 贾凤海, 朱欢兵, 2011. 江西桃红岭中华虎凤蝶种群分布和数量调查. 江西中医学院学报, 23(2): 75 – 76]

Hu XQ, Yang ZF, 2019. Analysis of the genetic differentiation among different geographic populations of *Loxostege sticticalis* (Lepidoptera: Crambidae) in China based on mitochondrial *COI*, *Cytb* and *COII* genes. *Acta Entomol. Sin.*, 62(6): 720 – 733. [呼晓庆, 杨兆富, 2019. 基于线粒体 *CO* Ⅰ、*Cytb* 和 *CO* Ⅱ基因的中国草地螟不同地理种群遗传分化分析. 昆虫学报, 62(6): 720 – 733]

Hudson RR, Slatkin M, Maddison WP, 1992. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics*, 132(2): 583 – 589.

Jennings RM, Etter RJ, 2011. Exon-primed, intron-crossing (EPIC) loci for five nuclear genes in deep-sea protobranch bivalves: primer design, PCR protocols and locus utility. *Mol. Ecol. Resour.*, 11(6): 1102 – 1112.

Kodandaramaiah U, Weingartner E, Janz N, Leski M, Slove J, Warren A, Nylin S, 2012. Investigating concordance among genetic data, subspecies circumscriptions and hostplant use in the nymphalid butterfly *Polygonia faunus*. *PLoS ONE*, 7(7): e41058.

Kumar S, Stecher G, Tamura K, 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.*, 33(7): 1870 – 1874.

Li M, Zhou HC, Tan JC, Liu GH, 2012. Species diversity and faunaistic characteristics of butterflies in Wuyunjie National Nature Reserve, Hunan province. *Sichuan J. Zool.*, 30(6): 897 – 902. [李密, 周红春, 谭济才, 刘国华, 2012. 湖南乌云界蝴蝶物种多样性及区系特点研究. 四川动物, 30(6): 897 – 902]

Librado P, Rozas J, 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11): 1451 – 1452.

Liu H, Beckenbach AT, 1992. Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase Ⅱ gene among 10 orders of insects. *Mol. Phylog. Evol.*, 1(1): 41 – 52.

Liu G, Jiang GF, Pang HC, Hong F, 2013. The mitochondrial genome of the Chinese special butterfly *Luehdorfia chinensis* Leech (Lepidoptera: Papilionidae). *Mitochondr. DNA*, 24(3): 211 – 213.

Ramos-Onsins SE, Rozas J, 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol. Biol. Evol.*, 19: 2092 – 2100.

Rousset F, 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from *F*-statistics under isolation by distance. *Genetics*, 145(4): 1219 – 1228.

Sei M, Porter AH, 2007. Delimiting species boundaries and the conservation genetics of the endangered maritime ringlet butterfly (*Coenonympha nipisiquit* McDunnough). *Mol. Ecol.*, 16(16): 3313 – 3325.

Slatkin M, 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*, 236(4803): 787 – 792.

Su JH, Nan ZB, Zhang HY, Ji WH, 2017. Genetic differentiation of plateau zokor (*Eospalax baileyi*) among different geographical populations based on mtDNA *COI* gene sequences. *Acta Ecol. Sin.*, 37(17): 1 – 9. [苏军虎, 南志标, 张红艳, Ji WH, 2017. 基于线粒体 *COI* 序列变异的高原鼢鼠种群遗传分化研究. 生态学报, 37(17): 1 – 9]

Tajima F, 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3): 585 – 595.

Tan JC, Li M, Zhou HC, Wang P, Liu GH, Zhang WW, 2010. Discovery of a wild population of *Luehdorfia chinensis* (Lepidoptera: Papilionidae) in Hunan, China. *J. Hunan Agric. Univ.* (*Nat. Sci.*), 36(6): 683 – 684. [谭济才, 李密, 周红春, 王鹏, 刘国华, 张文武, 2010. 湖南首次发现中华虎凤蝶种群及其栖息地. 湖南农业大学学报(自然科学版), 36(6): 683 – 684]

Tong XS, Qian ZQ, 1992. An observation on the characteristics of *Luehorfia chinensis* Leech. *Zool. Res.*, 13(1): 4, 24. [童雪松, 潜祖琪, 1992. 中华虎凤蝶的生物学特性观察. 动物学研究, 13(1): 4, 24]

Wang WM, Zou ZW, Jia FH, Chen ZP, Xia B, 2010. Overview on the research of *Luehdorfia chinensis* Leech. *Jiangxi Plant Prot.*, 33(3): 100 – 104. [王文明, 邹志文, 贾凤海, 陈智平, 夏斌, 2010. 中华虎凤蝶研究简述. 江西植保, 33(3): 100 – 104]

Xie YL, Zhang HR, Li ZY, 2019. Analysis of genetic differentiation among geographic populations of *Helionothrips mube* (Thysanoptera: Thripidae) in southwestern China based on mitochondrial *COI* gene. *Acta Entomol. Sin.*, 62(3): 370 – 380. [谢艳兰, 张宏瑞, 李正跃, 2019. 基于线粒体 *COI* 基因的中国西南地区木领针蓟马地理种群的遗传分化分析. 昆虫学报, 62(3): 370 – 380]

Xue J, Su JW, Li JW, Chen QF, 2007. Genetic diversity among five geographical populations of *Chilo suppressalis* based on RAPD. *J. Hunan Agric. Univ.* (*Nat. Sci.*), 33(2): 160-163. [薛进, 苏建伟, 黎家文, 陈秋芳, 2007. 中国水稻二化螟5个地理种群遗传差异的RAPD分析. 湖南农业大学学报(自然科学版), 33(2): 160-163]

Yao HW, Ye GY, Hu C, Yuan DC, 1999. Effects of temperature on the larval survival, growth and development of *Luehorfia chinensis* Leech. *Entomol. Knowl.*, 36(4): 199-202. [姚洪渭, 叶恭银, 胡萃, 袁德成, 1999. 温度对中华虎凤蝶幼虫生存与生长发育的影响. 昆虫知识, 36(4): 199-202]

Yao XY, Xing LX, Takayoshi M, Su XH, 2008. The food plant replacing experimentation of *Luehdorfia* butterflies. *J. Northwest Univ.* (*Nat. Sci. Ed.*), 38(3): 439-442. [姚肖永, 邢连喜, 松村行荣, 苏晓红, 2008. 虎凤蝶取食不同寄主植物试验研究. 西北大学学报(自然科学版), 38(3): 439-442]

Yuan DC, Mai GQ, Xue DY, Hu C, Ye GY, 1998. The habitat, biology and conservation status of *Luehdorfia chinensis* (Lepidoptera: Papilionidae). *Biodiv. Sci.*, 6(2): 105-115. [袁德成, 买国庆, 薛大勇, 胡萃, 叶恭银, 1998. 中华虎凤蝶栖息地、生物学和保护现状. 生物多样性, 6(2): 105-115]

Zhang DZ, Tang BP, Sun HY, Zhang HB, 2008. Application of DNA molecular markers in phylogeographical research of shrimps and crabs. *Fish. Sci.*, 27(5): 262-265. [张代臻, 唐伯平, 孙红英, 张华彬, 2008. DNA分子标记在虾蟹类系统地理学研究中的应用. 水产科学, 27(5): 262-265]

Zhu SY, Xu W, Gao Y, Cui J, Ou SQ, Shi SS, 2017. Analysis of the genetic differentiation among geographic populations of *Leguminivora glycinivorella* (Lepidoptera: Olethreutidae) in China based on mitochondrial *COII* gene sequences. *Acta Entomol. Sin.*, 60(4): 475-486. [朱诗禹, 徐伟, 高宇, 崔娟, 欧师琪, 史树森, 2017. 基于线粒体*CO*Ⅱ基因的中国大豆食心虫不同地理种群遗传分化分析. 昆虫学报, 60(4): 475-486]

(责任编辑: 马丽萍)